DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.170230

陈鑫, 马超, 杨永娟, 王红玲, 黄盈, 张晓霞, 黄开封, 赵卓, 张素芝. 转碱蓬 *SsNHX1* 基因烟草的耐盐抗旱性研究[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(10): 1518−1526

Chen X, Ma C, Yang Y J, Wang H L, Huang Y, Zhang X X, Huang K F, Zhao Z, Zhang S Z. Overexpression of *Suaeda salsa SsNHX1* gene enhanced salt and drought tolerance of transgenic tobacco[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2017, 25(10): 1518−1526

转碱蓬 *SsNHX1* 基因烟草的耐盐抗旱性研究*

陈 鑫[1], 马 超[1], 杨永娟[2], 王红玲[1], 黄 盈[1], 张晓霞[1], 黄开封[1], 赵 卓[1], 张素芝[1**]

(1. 四川农业大学玉米研究所/农业部玉米生物与遗传改良重点实验室 成都 611130; 2. 沂南县铜井镇农业综合服务中心 沂南 276300)

摘 要: 烟草是重要的模式植物和经济作物, 盐害和干旱两种环境因子对其生长发育、产量和品质都危害很大。为了提高烟草的耐盐抗旱性, 本研究利用农杆菌介导的遗传转化法在烟草中过量表达了碱蓬液泡膜 Na^+/H^+逆向转运基因 *SsNHX1*, 对转基因烟草的耐盐及抗旱性进行表型鉴定和各项生化指标的检测, 以期得到耐盐抗旱表性良好的 *SsNHX1* 转基因烟草。表型分析发现, *SsNHX1* 基因过表达株系 L1 和 L5 的抗盐能力比野生型显著提高, 表现为盐胁迫条件下仍能保持旺盛的生长且根系的伸长未受抑制。*SsNHX1* 过表达株系在叶片和根系中积累了更多的 Na^+和 K^+, 同时 Na^+含量增长速率较快, 而 K^+含量降低速率较缓, 并可维持较高的叶片相对含水量和叶绿素含量, 及较低的丙二醛含量和相对电导率。干旱胁迫发现, 过表达株系受干旱胁迫程度更小, 并在复水后迅速恢复正常生长。同时, 过表达株系的丙二醛含量和相对电导率显著低于野生型, 且维持了较高的叶片相对含水量及叶绿素含量。这些结果说明 *SsNHX1* 基因在烟草中过量表达后, 降低了盐胁迫和干旱胁迫对烟草根系及细胞膜的损伤, 并通过调节离子含量、降低细胞的渗透势, 维持了叶片较高的相对含水量和叶绿素含量, 最终提高了烟草的抗盐和抗旱性。

关键词: *SsNHX1* 基因; 转基因; 烟草; 耐盐性; 抗旱性; 表型; 生化指标

中图分类号: S188 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2017)10-1518-09

Overexpression of *Suaeda salsa SsNHX1* gene enhanced salt and drought tolerance of transgenic tobacco*

CHEN Xin[1], MA Chao[1], YANG Yongjuan[2], WANG Hongling[1], HUANG Ying[1], ZHANG Xiaoxia[1], HUANG Kaifeng[1], ZHAO Zhuo[1], ZHANG Suzhi[1**]

(1. Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Maize in Southwest China, Ministry of Agriculture, Chengdu 611130, China; 2. Agricultural Service Center of Tongjing Town, Yinan County, Yinan 276300, China)

Abstract: Tobacco (*Nicotiana tobacum* L.) is an important economic and model plant. Salt and drought are two important environmental factors that are harmful to plant growth, development, production and quality of tobacco. In addition to conventional salt and drought prevention measures, genetic engineering of plants has also been proven to be effective. In order to

* 国家自然科学基金项目(30800687, 31071434)资助
** 通讯作者: 张素芝, 主要从事植物抗逆生理研究。E-mail: suzhi1026@163.com
陈鑫, 主要研究植物抗逆生理。E-mail: 446035286@qq.com
收稿日期: 2017-03-16 接受日期: 2017-05-30

* This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (30800687, 31071434).
** Corresponding author, E-mail: suzhi1026@163.com
Received Mar. 16, 2017; accepted May 30, 2017

improve salt and drought tolerance of tobacco, Na^+/H^+ anti-porter gene *SsNHX1* was cloned from *Suaeda salsa* salt-tolerant plant and overexpressed in tobacco by *agrobacterium*-mediated genetic transformation. The differences in salt tolerance and drought resistance were compared by determining phenotypic and physiological indexes of wild and transgenic tobacco L1 and L5. Phenotypic analysis showed that salt tolerance of *SsNHX1* transgenic tobacco lines L1 and L5 were significantly higher than that of the wild type. This was evident from the vigorously growth and uninhibited root elongation under salt stress condition. The overexpressed transgenic lines of tobacco accumulated more Na^+ and K^+ in the both leaves and roots and with faster rate of increase of Na^+ and slower decreasing rate of K^+. The lines also maintained significantly higher contents of relative leaf water and chlorophyll, but lower malondialdehyde contents and relative conductivities. The results indicated that overexpression of *SsNHX1* gene apparently promoted compartmentalization of Na^+ from vacuolar cells into vacuoles and improved salt tolerance of transgenic plants of tobacco. On the other hand, *SsNHX1* transgenic tobacco plants showed significant enhancement of drought tolerance than the wild type and restored normal growth after rehydration. Under drought stress, the contents of malondialdehyde and relative conductivities of transgenic lines were lower than those of the wild type, while the relative water and chlorophyll contents of leaves were maintained. The results suggested that under drought stress, overexpressed *SsNHX1* in tobacco reduced damage to cell membrane by reducing osmotic potential of cells, maintaining relative water and chlorophyll content of leaves, and finally improved drought resistance of tobacco.
Keywords: *SsNHX1* gene; Gene transformation; *Nicotiana tobacum* L; Salt tolerance; Drought tolerance; Phenotype; Biochemical index

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是重要的模式植物和经济植物，盐害和干旱两种环境因子对其生长发育、产量和品质都危害很大。通过基因工程手段可以改善植物对这两种胁迫的抗逆性。

植物耐盐抗旱机制有很多种，包括渗透调节和有害离子区室化等。Na^+区室化是一个缓解植物体内因渗透势引起的盐胁迫危害的关键方法[1]。Na^+/H^+逆向转运蛋白(Na^+/H^+ exchange, NHX)是 Na^+外排和区室化的主要载体蛋白[2]，通过 Na^+螯合作用作为盐耐受性的重要决定因素[3-5]，也有其他方式可以调节如反转录酶[6-7]。液泡 NHX 的主要作用是维持膜系统的 pH 值，控制 K^+和 Na^+体内平衡，并调节叶片的发育。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的 *AtNHX1* 基因是典型的液泡 NHX; *AtNHX1* 的过表达使酵母 *nhx1* 突变体具有耐盐性[8]，并导致液泡 NHX 的活性增加，两者结合使 NHX 蛋白水平表达提高[9]。*AtNHX1* 通过液泡膜[9-10]将 Na^+区室化到液泡中，并在蛋白重构脂质体中催化 Na^+/H^+的逆向转运[11]。在盐胁迫下，液泡中 Na^+浓度随着 *AtNHX1* 表达量的增加而持续增加，说明植物液泡 NHX 有区室化 Na^+的作用，这为研究 NHX 类蛋白的功能和应用其改善植物的耐盐性提供了思路。*AtNHX1* 在拟南芥[12]、玉米(*Zea mays* L.)[13]、欧洲油菜(*Brassica napus* L.)[14]、棉花(*Gossypium herbaceum* L.)[15]、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)[16]、水稻(*Oryza sativa* L.)[17]、烟草[18]杨树(*Populus* spp.)[19]等植物中的过表达都增加了这些植物的耐盐性。盐生植物碱蓬(*Suaeda salsa* L.)的 *SsNHX1* 基因编码对 Na^+/H^+逆向转运蛋白具有很高的活性，在盐胁迫下 *SsNHX1* 的表达会提高，且在根系中比在叶片的表达量更高[19]。与野生型相比，*SsNHX1* 基因过表达的转基因水稻耐盐性更强，表明 *SsNHX1* 在碱蓬的盐耐受性中起了重要作用[20]。*SsNHX1* 转基因拟南芥在高盐处理条件下能保持正常的发芽率且能正常生长并且完成其整个生命周期，而野生型的拟南芥则生长和发育迟缓。

烟草是我国的一大经济作物，但是长期以来烟草生产严重受干旱和盐害的影响。由于 *SsNHX1* 基因转化拟南芥和水稻后具有明显的耐盐作用，因此本试验将 *SsNHX1* 转化烟草，并对其转基因烟草的耐盐及干旱性进行表型鉴定和各项生化指标的检测，以期得到耐盐抗旱表性良好的 *SsNHX1* 转基因烟草。

1　材料与方法

1.1　植物生长条件

1.1.1　烟草幼苗在营养液中的培养

野生烟草('Wisconsin 38')和 *SsNHX1* 转基因烟草 T_3 代株系 L1、L2、L3、L4、L5 的种子在 28 ℃暗发芽 3 d 后，将幼苗转移到 Hoagland 的营养液中，在人工气候室(14 h 光照/10 h 黑暗，18~25 ℃，RH 为 60%~80%)进行培养，每天更换一次营养液。

1.1.2　烟草幼苗在土壤中的培养

将野生型烟草和转 *SsNHX1* 基因烟草 T3 代株系(L1、L2、L3、L4、L5)的种子植入装有普通土：营养土为 3∶1 的塑料营养钵中，在人工气候室(14 h 光照/10 h 黑暗，18 ℃/25 ℃，RH 为 60%~80%)进行培养，待幼苗长至 3~4 叶时移栽。

1.2　*SsNHX1* 过表达转基因烟草的分子鉴定

水培烟草幼苗长到 5~6 叶期，用含 5 $g\cdot L^{-1}$ NaCl

的 Hoagland 营养液处理 24 h，提取叶片 DNA 以及 Trizol 法提取叶片 RNA。*SsNHX1* 基因通过 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切位点连接在植物表达载体 pCPB(改自 pCambia3300)的 35S 启动子之后(图 1a)，用于检测转基因植物中的 *SsNHX1* 片段的引物是 tSsNHX1-F(5′-AGGGAGCAAAGACAAGAG-3′)和 tSsNHX1-R(5′-TCTTCTATCTGAGCGGAATT-3′)。并使用引物 qSsNHX1-F(5′-GTCATTTGGTGGGCTGGTCTC-3′)和 qSsNHX1-R(5′-TGAAAAGGACAACGGTTATGGTG-3′)进行 RT-PCR 检测，筛选出 *SsNHX1* 基因高表达株系。

1.3 盐胁迫下 *SsNHX1* 转基因烟草耐盐性分析

将溶液培养的 *SsNHX1* 转基因株系 L1 和 L5 及野生型烟草幼苗，用 0 g·L^{-1}、2.5 g·L^{-1}、5 g·L^{-1}、7.5 g·L^{-1} NaCl 进行处理，每个株系 3 株烟草，每个盐浓度处理重复 3 次，处理 7 d，每 2 d 更换一次营养液。处理结束取样，用根系扫描仪扫描根系，观察烟草幼苗的生长状况并测量根系的长度；随后用火焰分光光度计分别测定野生型和转基因烟草株系的根系和叶片中 Na^+和 K^+离子含量。

1.4 干旱胁迫下 *SsNHX1* 转基因烟草耐旱性分析

土壤培养的 *SsNHX1* 转基因株系 L1 和 L5 及野生型幼苗长至 9~10 叶期，每个株系 3 株烟草，每个处理天数重复 3 次，进行断水 12 d 干旱处理后再复水 3 d，从每株叶片中间部分取样，观测其在断水 0 d、3 d、6 d、9 d、12 d 及复水 1 d、3 d 的生长情况。

1.5 盐胁迫和干旱胁迫下 *SsNHX1* 转基因烟草生理生化指标测定

分别将盐胁迫和干旱胁迫处理后的野生型和 *SsNHX1* 转基因株系 L1 和 L5 烟草进行生理生化指标的鉴定，包括：相对含水量(relative water content, RWC)[21]、叶绿素含量[22]、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量[23]、相对电导率[24]。所得数据用 SPSS 13.0 软件分析，并用 Microsoft Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *SsNHX1* 过表达转基因烟草的分子鉴定

SsNHX1 基因转化烟草后，得到 35S 启动子驱动下过量表达的烟草转基因株系(图 1a)，通过将 *SsNHX1* 基因过表达烟草株系 L1、L2、L3、L4、L5 以及野生型进行 PCR 检测，发现除野生型烟草外，5 个转基因株系均有明显的目的条带，说明 *SsNHX1* 基因已整合至这些转基因株系中(图 1b)。为了后续的表型分析及盐和干旱胁迫下的生理生化指标测量，对上述 5 个转基因阳性株系以及野生型烟草又进行了 RT-PCR 检测，发现 L1、L4、L5 的表达量最高，因此选用其中的 L1 和 L5 转基因株系用于后续试验(图 1c)。

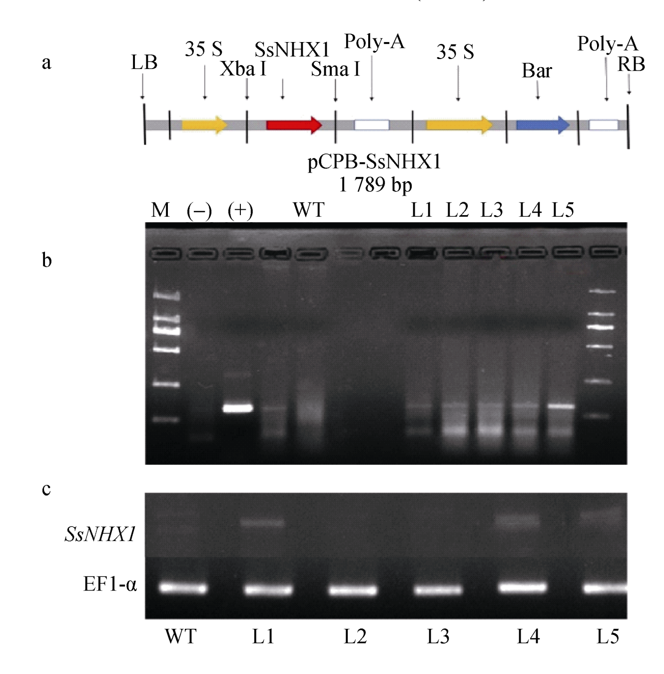


图 1 植物表达载体 pCPB-35S-*SsNHX1* 和转基因烟草的分子检测

Fig. 1 Schematic of the expression vector pCPB-35SN-S*sNHX1* and molecular detection of *SsNHX1*-transgenic tobacco plants

a：将 *SsNHX1* 开放阅读框(ORF)插入 CaMV 35S 启动子和胭脂碱合酶终止子(Nos)区域之间，Bar 基因用作选择性标记。b：转基因烟草的 PCR 检测；M 表示 DNA marker DL2000；(–)表示 H_2O；(+)表示质粒 DNA；WT 表示用空载体转化的野生型烟草植物；L1–L5 表示独立的转基因烟草品系。c：转基因株系和 WT 植物中 *SsNHX1* 基因的表达分析。a: the *SsNHX1* open reading frame (ORF) was inserted between the CaMV 35S promoter and nopaline synthase terminator (Nos) regions. The bar gene was used as the selective marker. b: PCR detection of the transgenic maize plants; M is DNA marker DL2000; (–) means H_2O; (+) means plasmid DNA; WT means wild-type tobacco plant transformed with empty vector; L1-L5 are independent transgenic tobacco lines. c: expression analysis of *SsNHX1* transgenic tobacco lines and WT plants.

2.2 *SsNHX1* 转基因烟草在盐胁迫下的表型分析

由图 2a 可以看出，在盐胁迫处理前，野生型和转基因烟草之间表型没有显著差异。用 2.5 g·L^{-1} NaCl 处理 7 d 后野生型和转基因烟草的生长发育都仍未受抑制。但在 5 g·L^{-1} NaCl 胁迫条件下，野生型烟草的生长相对于转基因烟草受到明显抑制：根系数量减少、根长变短、叶片变少、变小。当 NaCl 浓度高达 7.5 g·L^{-1}时，野生型烟草在胁迫的第 5 d 时叶片开始发黄、融烂，最终死亡。而转基因株系 L1 和 L5 的植株生长虽然随着盐胁迫浓度的升高逐渐变缓，但依然能保持生长状态，比野生型表现出更好的抗盐性。

由于盐胁迫对植物根长具有显著的抑制作用，本试验对 *SsNHX1* 转基因烟草与野生型在盐胁迫下

的根长进行了研究。在无盐胁迫下，两者总根长无显著性差异，但在盐胁迫下，转基因烟草 L1 和 L5 与野生型的总根长差异显著(图 2b)。且随着盐处理浓度的升高，野生型的总根长明显变短，而转基因株系 L1 和 L5 的总根长降低幅度较小，如在 7.5 $g \cdot L^{-1}$ NaCl 浓度处理下转基因株系 L1 和 L5 根长分别是野生型烟草的 2.64 和 2.72 倍，差异显著。说明盐胁迫虽然都抑制着烟草根系的生长，但转基因株系受到的抑制作用相对较轻，基本不影响其根系的生长发育。



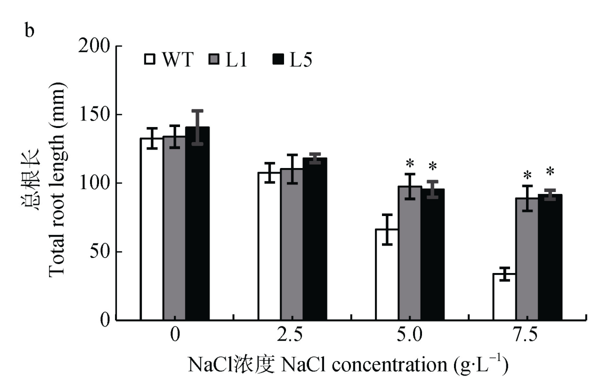


图 2　盐胁迫处理后 ***SsNHX1*** 转基因烟草和野生型的表型(a)及根长(b)

Fig. 2　Phenotype (a) and root length (b) of *SsNHX1*-transgenic tobacco plants and wide type plants after salt stress treatment

a: 幼苗在 0 $g \cdot L^{-1}$、0.25 $g \cdot L^{-1}$、0.50 $g \cdot L^{-1}$和 0.75 $g \cdot L^{-1}$的 NaCl 梯度浓度霍格兰溶液中培养，直到三叶期；b: 经过 NaCl 浓度梯度处理后的根长。WT 为野生型烟草；L1 和 L5 为 *SsNHX1* 烟草转基因株系；*表示差异显著，误差线表示标准方差。a: seedlings were hydrated with Hoagland nutrient solution with an increased NaCl gradient of 0 $g \cdot L^{-1}$, 2.5 $g \cdot L^{-1}$, 5 $g \cdot L^{-1}$ and 7.5 $g \cdot L^{-1}$ (*w*/*v*) until the three-leaf stage; b: root length after immersion in 0 $g \cdot L^{-1}$, 2.5 $g \cdot L^{-1}$, 5 $g \cdot L^{-1}$, and 7.5 $g \cdot L^{-1}$ NaCl. WT is wild type tobacco; L1 and L5 are *SsNHX1* transgenic tobacco lines. * indicates significant difference. Values of error bar are means standard deviation.

2.3　*SsNHX1* 转基因烟草在盐胁迫条件下根系和叶片的 Na^+和 K^+含量

植物体吸收过高的 Na^+，会导致植物体营养离子的失衡，特别是 K^+的吸收抑制和流失。在盐胁迫条件下液泡 Na^+/H^+逆向转运蛋白则会将 Na^+转运至液泡中，减少 K^+散失[25]。在本试验中，经 NaCl 处理后，野生型和转基因烟草植株叶片和根系中的 Na^+含量都迅速增加。例如，在 7.5 $g \cdot L^{-1}$ NaCl 处理时，野生型烟草叶片中的 Na^+由 15.84 $mg \cdot g^{-1}$ 上升至 52.53 $mg \cdot g^{-1}$，而转基因烟草 L1 和 L5 则分别由 18.09 $mg \cdot g^{-1}$ 上升至 60.37 $mg \cdot g^{-1}$ 和由 20.04 $mg \cdot g^{-1}$ 显著上升至 63.35 $mg \cdot g^{-1}$。同样，根系中野生型及转基因烟草 L1 和 L5 Na^+含量分别显著上升至 40.48 $mg \cdot g^{-1}$、42.77 $mg \cdot g^{-1}$、53.75 $mg \cdot g^{-1}$(图 3a, 3b)。随着 NaCl 处理浓度的增加，叶片和根系中的 K^+含量降低。例如，在 7.5 $g \cdot L^{-1}$ NaCl 处理后的叶片中，野生型叶片中的 K^+含量由 79.76 $mg \cdot g^{-1}$降至 46.13 $mg \cdot g^{-1}$，而转基因烟草 L1 和 L5 则分别由 79.04 $mg \cdot g^{-1}$ 降至 58.76 $mg \cdot g^{-1}$和由 80.17 $mg \cdot g^{-1}$降至 53.03 $mg \cdot g^{-1}$，差异显著。同样，在根系中野生型及转基因烟草 L1 和 L5 的 K^+含量分别降低到 29.44 $mg \cdot g^{-1}$、32.04 $mg \cdot g^{-1}$、38.69 $mg \cdot g^{-1}$，差异显著(图 3c, 3d)。K^+和 Na^+根系中的变化趋势与叶片中趋势相同(图 3b, 3d)。与野生型相比，转基因烟草中 K^+含量随盐浓度的提高下降缓慢，而 Na^+含量增加较快。因此，转基因烟草植株比野生型拥有更高的 K^+/Na^+比。与根系相比，叶片中的 Na^+和 K^+的含量更高，尤其是在转基因植物中，表明胁迫条件下烟草的 Na^+的区室化主要发生在叶片中。

2.4　*SsNHX1* 转基因烟草在盐胁迫条件下生理指标的变化

盐胁迫可以诱导植物体内一系列的生理变化，如相对含水量、丙二醛含量、相对电导率和叶绿素含量的变化，而这些变化通常与盐胁迫具有一定的相关性。从图 4a 可知，当 NaCl 处理 6 d 时，野生型和转基因烟草植株相对含水量都开始降低。从 9 d 开始到 15 d 时野生型和转基因烟草的相对含水量下降幅度变大且差异显著。对于叶绿素而言，其在野生型烟草中的含量随着时间的增加下降幅度越来越大，并在 15 d 降到 0.65 $mg \cdot g^{-1}$，与转基因烟草株系 L1(1.51 $mg \cdot g^{-1}$)和 L5 的(1.68 $mg \cdot g^{-1}$)达到最大差值(图 4b)。

丙二醛含量和相对电导率的含量，则与上述的相对含水量和叶绿素含量趋势相反。在本试验中都是随着 NaCl 处理时间的增加而呈上升的趋势，且野生型的含量大于转基因株系(图 4c，图 4d)。例如, NaCl 处理 15 d 时，野生型烟草丙二醛的含量为 9.71 $nmol \cdot g^{-1}$，而转基因株系 L1 和 L5 分别为 8.75 $nmol \cdot g^{-1}$和 7.34 $nmol \cdot g^{-1}$，比野生型显著降低。同样, NaCl 处理 15 d 后，野生型的相对

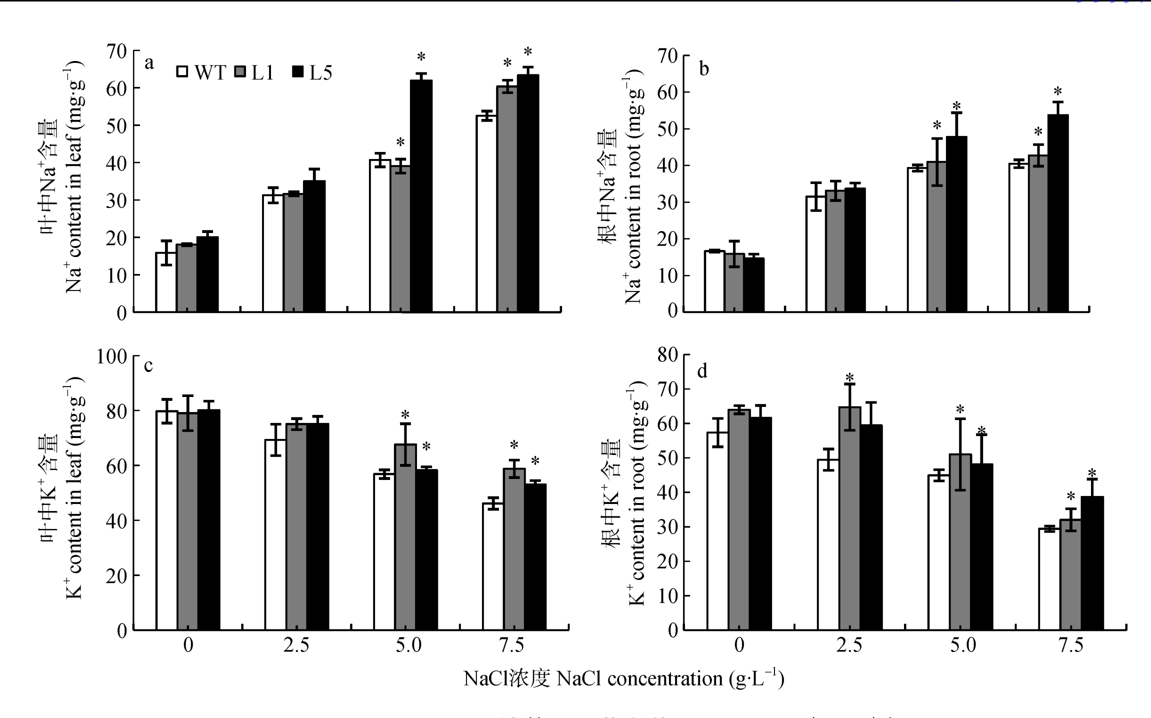


图 3　野生型和 *SsNHX1* 转基因烟草在盐胁迫下的 Na^+和 K^+含量

Fig. 3　Na^+ and K^+ contents of wide type and *SsNHX1*-transgenic tobacco plants under salt stress

WT 为野生型烟草, L1 和 L5 为 *SsNHX1* 转基因烟草株系; *表示差异显著, 误差线表示标准方差。WT is wild type tobacco plant; L1 and L5 are *SsNHX1* transgenic tobacco lines. * indicates significant difference. Values of error bar are means standard deviation.

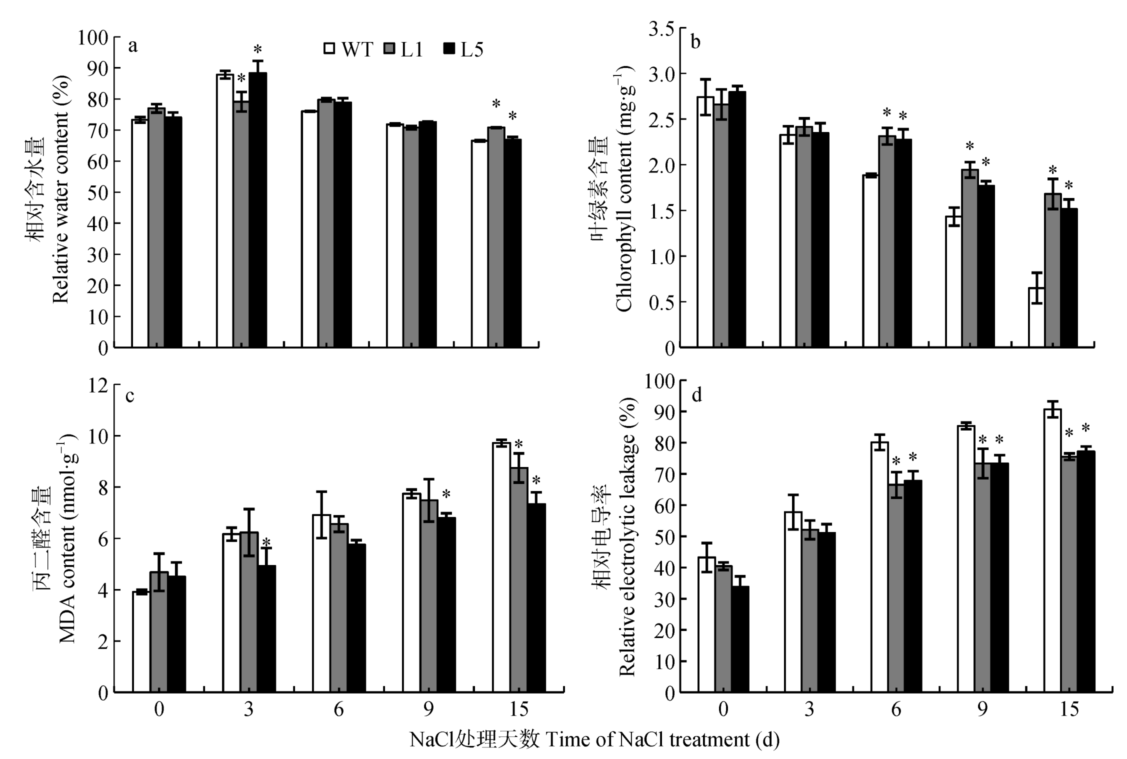


图 4　盐胁迫条件下 *SsNHX1* 转基因烟草生理指标的变化

Fig. 4　Changes of the physiological indexes of *SsNHX1*-transgenic tobacco under salt stress

WT 为野生型烟草, L1 和 L5 为 *SsNHX1* 转基因株系; *表示差异显著, 误差线表示标准方差。WT is wild type tobacco plant; L1 and L5 are *SsNHX1* transgenic tobacco lines. * indicates significant difference. Values of error bar are means standard deviation.

电导率为 90.68%而转基因株系 L1 和 L5 分别为 75.52%和 77.20%, 差异显著。这些结果表明, *SsNHX1* 转基因植物的生理变化与其增强的耐盐表型密切相关。

2.5　*SsNHX1* 转基因烟草在干旱胁迫下的表型分析

很多研究的结果已表明抗盐和抗旱相关联。如图 5 所示, 断水处理 3 d 时, *SsNHX1* 转基因烟草和野

生型并没有明显的差异(图 5a, b)，但在断水处理 6 d 后，野生型烟草开始有萎蔫的趋势，此时转基因烟草仍能正常生长(图 5c)。断水处理 9 d 时，野生型烟草叶片缩小卷曲，萎蔫严重，而转基因株系 L1 和 L5 只表现出轻微程度的萎蔫和叶片发黄(图 5d)；断水处理 12 d 时，野生型烟草以及转基因烟草都严重萎蔫，但相较之下转基因株系 L1 萎蔫程度较轻(图 5e)；但经过 1 d 复水后，虽然转基因烟草的叶片的叶绿素肉眼仍能可见其明显减退，却能迅速地恢复到断水前较为挺拔的生长状态，野生型却依然萎蔫，甚至持续至复水 3 d 时，说明其生理失水严重，已不能靠自身调节恢复正常生长(图 5f, g)。



图 5　野生型(中)和转基因烟草株系 L1(左)和 L5(右)在干旱处理下的生长情况

Fig. 5　Growth phenotypes of wild type (middle) and transgenic tobacco L1 (left) and L5 (right) under drought treatment

a：干旱处理前；b：干旱 3 d；c：干旱 6 d；d：干旱 9 d；e：干旱 12 d；f：复水 0 d；g：复水 3 d。WT 为野生型烟草，L1 和 L5 为 *SsNHX1* 转基因烟草。a: before drought treatment; b: three days of drought; c: six days of drought; d: nine days of drought; e: twelve days of drought; f: rehydrate for 0 day; g: rehydrated for three days. WT is wild type tobacco plant; L1 and L5 are *SsNHX1* transgenic tobacco lines.

2.6　*SsNHX1* 转基因烟草在干旱胁迫下生理指标的变化

同其他胁迫因子一样，干旱胁迫同样会对植物生理变化造成影响。干旱胁迫下 *SsNHX1* 转基因烟草的的相对含水量和叶绿素含量变化总体趋势与其在上述盐胁迫下相当，即随着处理时间延长含量下降(图 6a, 6b)。当断水处理 12 d 时，野生型烟草相对含水量降至 63.40%，而转基因株系 L1 和 L5 的分别为 70.56%和 69.02%，差异显著。此时叶绿素含量野生型(0.94 $mg\cdot g^{-1}$)和转基因烟草 L1(1.77 $mg\cdot g^{-1}$)和 L5(1.78 $mg\cdot g^{-1}$)的差异也达到最大值，差异显著。在断水处理的过程中，相对电导率以及丙二醛在 *SsNHX1* 野生型和转基因烟草中都呈上升趋势，但在野生型中上升的趋势更加明显。处理 12 d 时，野生型烟草丙二醛含量为 4.67 $nmol\cdot g^{-1}$，转基因株系 L1 和 L5 分别为 3.73 $nmol\cdot g^{-1}$和 3.90 $nmol\cdot g^{-1}$(图 6c)。而相对电导率则为野生型植株大于转基因植株，如处理 12 d 时野生型的相对电导率为 84.92%，而转基因烟草 L1 和 L5 分别为 70.72%和 72.92%(图 6d)。

3　讨论与结论

为了有效地抗击盐和干旱胁迫以维持植物体内 Na^+和 K^+等的离子平衡，植物能将 Na^+外排，吸收或区室化至液泡中，以此增强它们对盐和干旱胁迫的耐受性[26]。在该调节过程中，液泡膜 Na^+/H^+逆向转运蛋白发挥着关键作用，而编码这类蛋白的 NHX 型基因的过量表达能改善许多物种转基因植株的耐盐性[27]。*SsNHX1* 基因是盐生植物碱蓬的 NHX 型基因，盐胁迫下能提高表达水平，并显著改善水稻和拟南芥的耐盐性[28-29]。然而，关于 *SsNHX1* 在其他植物中的抗盐和抗旱研究尚鲜见报道。因此，本研究通过基因工程手段过量表达 *SsNHX1* 基因，以改善烟草的耐盐抗旱性。

植物耐盐性与耐旱性密切相关。在许多转基因品系中，耐盐性的提高通常伴随耐旱性的增强。在本研究中，*SsNHX1* 转基因烟草与野生型相比，在高盐浓度下根部依然可以正常发育，用递增盐浓度处理时表现出强耐盐表型；在干旱胁迫下表现出强耐旱表型，并且在复水后能基本恢复缺水前的表型。说明转基因烟草的耐盐性和抗旱性都比野生型有所提高。与之相似，*AtNHX1* 转化拟南芥及 *TNHX1* 转化小麦时分别提高了转基因植物的耐盐抗旱性[30-31]。这些结果表明，液泡 *NHX* 基因的过量表达能提高转基因植物应对盐胁迫和干旱胁迫的能力。

在盐胁迫条件下，液泡 NHX 蛋白不仅会排出 Na^+，同时也会吸收 K^+，以此来保持植物体内 Na^+/K^+的平衡。在本试验中，经 NaCl 胁迫处理后，

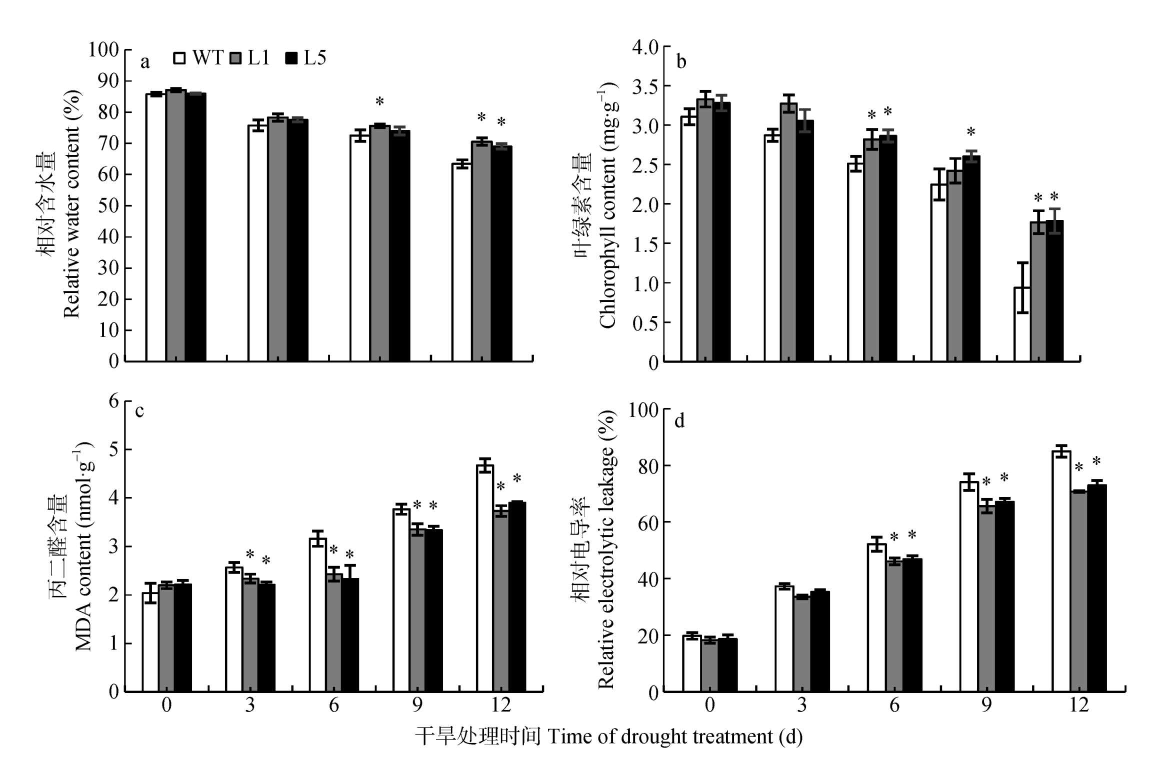


图 6 干旱胁迫条件下 *SsNHX1* 转基因烟草生理指标的变化

Fig. 6 Changes of the physiological index of *SsNHX1*-transgenic tobacco under salt stress

WT, 野生型烟草; L1 和 L5, *SsNHX1* 转基因株系。*表示差异显著, 误差线表示标准方差。WT, wild type plant; L1 and L5, *SsNHX1* transgenic tobacco lines. * indicates significant differences. Values of error bar are means standard deviation.

Na^+含量在 *SsNHX1* 转基因烟草的叶片和根系中明显增加, 且叶片中的含量比根系中高。这可能是由于 *SsNHX1* 活性增强后, 将烟草叶片中的 Na^+直接区室化到液泡中所致[32-33]。这与液泡膜的 Na^+/H^+逆向转运蛋白表达量增加会增强 Na^+区室化的研究一致[34]。但是由于目前的研究技术尚无法从从细胞质中分离液泡[4], 因此 *SsNHX1* 等液泡 *NHX* 对 Na^+和 K^+在细胞质和液泡中更精细地分配尚待进一步的研究。保持植物体内较低的 Na^+/K^+可以有效地降低植物渗透势以达到吸水的目的, 这与 *TaNHX2* 转基因番茄[35]和 *AtNHX1* 转基因矮牵牛[*Petunia hybrida* (J. D. Hooker) Vilmorin]中的发现相似[36]。这些结果说明液泡 *SsNHX1* 基因的过量表达提高转基因烟草的耐盐能力, 在一定程度上可能通过将 Na^+区室化有效地调节细胞内渗透压的平衡而实现烟草的耐盐能力。

与 *SsNHX1* 转基因烟草的生理指标相比, 盐害和干旱胁迫下野生型的相对水含量都较低, 表明转基因烟草表现出改善的调节叶渗透压和保水性的能力, 在这些胁迫条件下能保持适当的渗透压。*SsNHX1* 转基因烟草的叶绿素含量虽然在盐胁迫和干旱胁迫下有所降低, 但仍高于野生型, 这可能与高浓度 Na^+和低含水量会抑制光合系统Ⅰ和Ⅱ, 导致光合作用和叶绿素合成速率降低有关[37-38]。此结果与 *AtNHX1* 转基因棉花[14], *SsNHX1* 转基因水稻[39], *VxNHX*[40]和 *MdNHX1*[41]转基因拟南芥以及 *ThDREB* 转基因烟草[42]的研究一致。在本试验中, *SsNHX1* 转基因和野生型烟草中 MDA 含量和相对电导率均增加, 表明在盐和干旱胁迫条件下质膜受到损伤, 并且野生型比转基因烟草受到的损伤更严重, 表明 *SsNHX1* 转基因烟草在盐害和干旱胁迫下降低了对质膜的损害。

总之, 本研究的结果表明, *SsNHX1* 基因编码的液泡膜 Na^+/H^+逆向转运蛋白, 能通过改变转基因烟草 Na^+和 K^+的比率降低胁迫对植物的损害程度。*SsNHX1* 在烟草中的过表达增强了转基因烟草的耐盐性和抗旱性。由相对含水量、丙二醛含量、相对电导率和叶绿素含量的变化所反映的转基因烟草生理的变化也与其改善的耐盐抗旱性的能力相一致。

参考文献 References

[1] Niu X, Bressan R A, Hasegawa P M, et al. Ion homeostasis in NaCl stress environments[J]. Plant Physiology, 1995, 109(3): 735–742

[2] Hedrich R, Schroeder J I. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1989, 40: 539–569

[3] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(2): 66–71

[4] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(5): 441–445
[5] Rodríguez-Rosales M P, Gálvez F J, Huertas R, et al. Plant NHX cation/proton antiporters[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(4): 265–276
[6] Pitann B, Mohamed A K, Neubert A B, et al. Tonoplast Na^+/H^+ antiporters of newly developed maize (*Zea mays*) hybrids contribute to salt resistance during the second phase of salt stress[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2013, 176(2): 148–156
[7] Teng X X, Cao W L, Lan H X, et al. *OsNHX2*, an Na^+/H^+ antiporter gene, can enhance salt tolerance in rice plants through more effective accumulation of toxic Na^+ in leaf mesophyll and bundle sheath cells[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2017, 39(5): 113
[8] Gaxiola R A, Rao R, Sherman A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4): 1480–1485
[9] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*[J]. Science, 1999, 285(5431): 1256–1258
[10] Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2000, 12(4): 431–434
[11] Venema K, Quintero F J, Pardo J M, et al. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted liposomes[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(4): 2413–2418
[12] Yin X Y, Yang A F, Zhang K W, et al. Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of AtNHX1 gene[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(7): 854–861
[13] Zhang H X, Hodson J N, Williams J P, et al. Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(22): 12832–128326
[14] He C X, Yan J Q, Shen G X, et al. Expression of an Arabidopsis vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field[J]. Plant and Cell Physiology, 2005, 46(11): 1848–1854
[15] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(8): 765–768
[16] Chen H, An R, Tang J H, et al. Over-expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice[J]. Molecular Breeding, 2007, 19(3): 215–225
[17] Zhou S F, Zhang Z M, Tang Q L, et al. Enhanced V-ATPase activity contributes to the improved salt tolerance of transgenic tobacco plants overexpressing vacuolar Na^+/H^+ antiporter *AtNHX1*[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(2): 375–380
[18] Yang L, Liu H, Fu S M, et al. Na^+/H^+ and K^+/H^+ antiporters AtNHX1 and AtNHX3 from *Arabidopsis* improve salt and drought tolerance in transgenic poplar[J]. Biologia Plantarum, 2017, 241: 1–10
[19] Ma X L, Zhang Q, Shi H Z, et al. Molecular cloning and different expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene in *Suaeda salsa* under salt stress[J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(2): 219–225
[20] Zhao F Y, Wang Z L, Zhang Q, et al. Analysis of the physiological mechanism of salt-tolerant transgenic rice carrying a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from *Suaeda salsa*[J]. Journal of Plant Research, 2006, 119(2): 95–104
[21] 张慧, 汪沛洪. 叶片相对含水量的活体测定[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(3): 217–219
Zhang H, Wang P H. Determination of relative water, content in plant leaves *in vivo*[J]. Plant Physiology Newsletter, 1991, 27(3): 217–219
[22] 张宪政. 植物叶绿素含量测定方法比较研究[J]. 沈阳农学院学报, 1985, 16(4): 81–84
Zhang X Z. A comparison of methods of measurement of chlorophyl in plants[J]. Journal of Shenyang Agricultural College, 1985, 16(4): 81–84
[23] 赵世杰, 许长成, 邹琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207–210
Zhao S J, Xu C C, Zou Q, et al. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissue[J]. Plant Physiology Newsletter, 1994, 30(3): 207–210
[24] 陈爱葵, 韩瑞宏, 李东洋, 等. 植物叶片相对电导率测定方法比较研究[J]. 广东教育学院学报, 2010, 30(5): 88–91
Chen A K, Han R H, Li D Y, et al. A comparison of two methods for electrical conductivity about plant leaves[J]. Journal of Guangdong Education Institute, 2010, 30(5): 88–91
[25] Shabala S, Cuin T A. Potassium transport and plant salt tolerance[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(4): 651–669
[26] Flowers T J, Munns R, Colmer T D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes[J]. Annals of Botany, 2015, 115(3): 419–431
[27] Deinlein U, Stephan A B, Horie T, et al. Plant salt-tolerance mechanisms[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(6): 371–379
[28] Lin Y A, Zhang C L, Lan H, et al. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e95445
[29] Gao X H, Ren Z H, Zhao Y X, et al. Overexpression of *SOD2* increases salt tolerance of Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2003, 133(4): 1873–1881
[30] Wei Q, Guo Y J, Cao H M, et al. Cloning and characterization of an AtNHX2-like Na^+/H^+ antiporter gene from *Ammopiptanthus mongolicus* (Leguminosae) and its ectopic expression enhanced drought and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2011, 105(3): 309–316
[31] Brini F, Hanin M, Mezghani I, et al. Overexpression of wheat Na^+/H^+ antiporter TNHX1 and H^+-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis*

thaliana plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(2): 301–308

[32] Jha B, Mishra A, Jha A, et al. Developing transgenic *Jatropha* using the *SbNHX1* gene from an extreme halophyte for cultivation in saline wasteland[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71136

[33] Gálvez F J, Baghour M, Hao G P, et al. Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 51: 109–115

[34] Qiu N W, Chen M, Guo J R, et al. Coordinate up-regulation of V-H^+-ATPase and vacuolar Na^+/H^+ antiporter as a response to NaCl treatment in a C_3 halophyte *Suaeda salsa*[J]. Plant Science, 2007, 172(6): 1218–1225

[35] Yarra R, He S J, Abbagani S, et al. Overexpression of a wheat Na^+/H^+ antiporter gene (*TaNHX2*) enhances tolerance to salt stress in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2012, 111(1): 49–57

[36] Xu K, Hong P, Luo L J, et al. Overexpression of *AtNHX1*, a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from *Arabidopsis thalina*, in *Petunia hybrida* enhances salt and drought tolerance[J]. Journal of Plant Biology, 2009, 52(5): 453–461

[37] Allakhverdiev S I, Nishiyama Y, Suzuki I, et al. Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(10): 5862–5867

[38] Allakhverdiev S I, Sakamoto A, Nishiyama Y, et al. Inactivation of photosystems Ⅰ and Ⅱ in response to osmotic stress in *Synechococcus*. Contribution of water channels[J]. Plant Physiology, 2000, 122(4): 1201–1208

[39] Zhao F Y, Zhang X J, Li P H, et al. Co-expression of the *Suaeda salsa SsNHX1* and *Arabidopsis AVP1* confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single *SsNHX1*[J]. Molecular Breeding, 2006, 17(4): 341–353

[40] Mishra S, Alavilli H, Lee B H, et al. Cloning and functional characterization of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from mungbean (*VrNHX1*) and its ectopic expression enhanced salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e106678

[41] Sun M H, Ma Q J, Liu X, et al. Molecular cloning and functional characterization of *MdNHX1* reveals its involvement in salt tolerance in apple calli and *Arabidopsis*[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 215: 126–133

[42] Yang G Y, Yu L L, Zhang K M, et al. A ThDREB gene from Tamarix hispida improved the salt and drought tolerance of transgenic tobacco and T. hispida[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 113: 187–197